
ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA

VOL. IX, SUPPLEMENTUM

SECTIO EEE

2001

Akademia Medyczna w Łodzi¹
Politechnika Łódzka²

ALEKSANDER CHMIEL¹, BEATA PAWŁOWSKA², EWA KOCHAN¹,
STANISŁAW LEDAKOWICZ²

**Kultury korzeni transformowanych *Paulownia tomentosa* Steudt.
w kolbach wstrząsanych i bioreaktorze rozpyłowym***

Cultures of Transformed Roots of *Paulownia tomentosa* Steudt.
in Shake Flasks and Mist Bioreactor

Produkcja wielu ekonomicznie wartościowych substancji pochodzenia roślinnego, takich jak: enzymy, barwniki, substancje aromatyczne oraz substancje aktywne farmakologicznie, może być ograniczona wieloma czynnikami: zbyt niską szybkością wzrostu roślin, specyficznymi wymaganiami klimatycznymi i glebowymi, sezonowością uprawy, długim okresem uprawy, małą wydajnością produktu. Alternatywnym źródłem wymienionych produktów, a zwłaszcza metabolitów aktywnych farmakologicznie, mogą być roślinne kultury zawieszinowe (Chmiel, 1992; Furmanowa, 1992) i korzenie transformowane (Olszowska, 1992; Chmiel, 1997), nazywane także korzeniami trasgenicznymi lub — z powodu wyglądu — korzeniami włośnikowatymi.

Korzenie transformowane powstają w wyniku zakażenia roślin lub ich fragmentów bakteriami glebowymi z gatunku *Agrobacterium rhizogenes*. Fragment T-DNA z bakteryjnego plazmidu Ri zostaje przeniesiony i trwale wbudowany do jądrowego DNA komórki roślinnej (Olszowska, 1992; Nadolska, 1999). Korzenie genetycznie transformowane charakteryzuje szybki przyrost biomasy, stabilność genetyczna, wydajna, utrzymująca się na stałym poziomie biosynteza metabolitów (Chmiel, 1992; Olszowska, 1992). Kultury korzeni

*Praca finansowana przez Akademię Medyczną w Łodzi z pracy własnej nr 502-13-679.

mogą być prowadzone w sposób niezależny od wymienionych ograniczeń, w warunkach które można optymalizować metodami stosowanymi w biotechnologii.

Hodowle korzeni transformowanych stosunkowo łatwo przebiegają w kolbach wstrząsanych. Zastosowanie kolb nie pozwala jednak na uzyskanie dużej ilości biomasy. Istnieje więc konieczność powiększenia skali procesu i zastosowanie bioreaktorów. Pierwsze próby powiększenia skali hodowli związane były z użyciem bioreaktorów mieszadłowych zaprojektowanych do procesów mikrobiologicznych. Delikatna struktura korzeni włośnikowatych narażona jest w tych warunkach na działanie sił ścinających występujących w strefie pracy mieszadła (Whitney, 1992; Wilson i in., 1987). Podobne problemy występowały w przypadku zastosowania bioreaktora bębnowego (Kondo i in., 1989) i bioreaktora typu air-lift (Taya i in., 1989 a,b), w którym mieszanie wymuszone jest strumieniem powietrza. Modyfikacje wspomnianych bioreaktorów polegające na oddzieleniu korzeni od strefy mieszania, pozwoliły na osiągnięcie zadowalających rezultatów (Kondo i in., 1989; Taya i in., 1989; Hilton, 1990). Wciąż trwają jednak prace nad skonstruowaniem najbardziej optymalnego bioreaktora do kultur korzeni transformowanych. Obiecujące wyniki osiągnięto w przypadku zastosowania bioreaktora rozpyłowego lub mgłowego (mist bioreactor) (Kondo i in., 1989; Diloirio, 1992), nie stosowanego dotychczas do hodowli drobnoustrojów. W Samodzielnej Pracowni Biosyntezy Środków Leczniczych Akademii Medycznej w Łodzi zaprojektowano i skonstruowano bioreaktor rozpyłowy (Chmiel, 1999), przeprowadzono także wstępne badania z wykorzystaniem korzeni transformowanych *Paulownia tomentosa*.

MATERIAŁ I METODA

W badaniach wykorzystano korzenie transformowane paulowni puszystej — *Paulownia tomentosa* Steudt. (*Scrophulariaceae*) szczep 1-3-1 G-25, otrzymane w Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Łodzi.

Kultury w kolbach wstrząsanych. Kultury korzeni transformowanych prowadzono w 300-ml kolbach Erlenmeyera zawierających po 80 ml podłoża WP (Lloydg, 1980) bez regulatorów wzrostu. Do kolb wprowadzano fragmenty korzeni w ilości około 0,02 g na kolbę. Kolby umieszczano w fitotronie w ciemności, w temperaturze 26°C i przy wilgotności 80-90% na wytrząsarce 100 obr./min. W tych warunkach kultury prowadzono przez 55 dni w trzech seriach po 3-5 powtórzeń. Co 5 dni pobierano próby w celu wyznaczenia krzywej wzrostu i zmian konduktancji.

Kultury w bioreaktorze. Hodowlę prowadzono w bioreaktorze rozpyłowym o pojemności 5 dm³. Do bioreaktora wprowadzano korzenie pochodzące z 35 dniowych kultur wstrząsanych w ilości około 1 g · dm⁻³. Masę korzeni z bioreaktora mierzono na końcu cyklu hodowli trwającego 5-6 tygodni.

Bioreaktor jest wykonany ze szkła i stali kwasoodpornej z wykorzystaniem dyszy rozpyłowej wykonanej z polipropylenu. Zasadniczy zbiornik szklany (Büchi) o pojemności całkowitej 5 dm³, ma kształt cylindra z wypukłym dnem i króćcem pozwalającym na całkowity spływ nadmiaru pożywki. Pokrywa wyposażona jest w króciec inokulacyjny, króciec odprowadzający powietrze oraz króciec pozwalający na wprowadzenie czujnika temperatury. Pomiar czujnika sterują pracą zewnętrznego ultratermostatu. W górnej części bioreaktora znajduje się siatka ze stali kwasoodpornej, na której umieszczone są korzenie.

Zbiornik pośredniczący szklany (Büchi) o pojemności 1,5 dm³ służący jako rezerwuuar pożywki, wyposażony jest w płaszcz termostatowy i króćce: doprowadzający i wyprowadzający pożywkę oraz umożliwiające pobranie prób, wprowadzenie elektrod pomiarowych oraz wyrównujący ciśnienie.

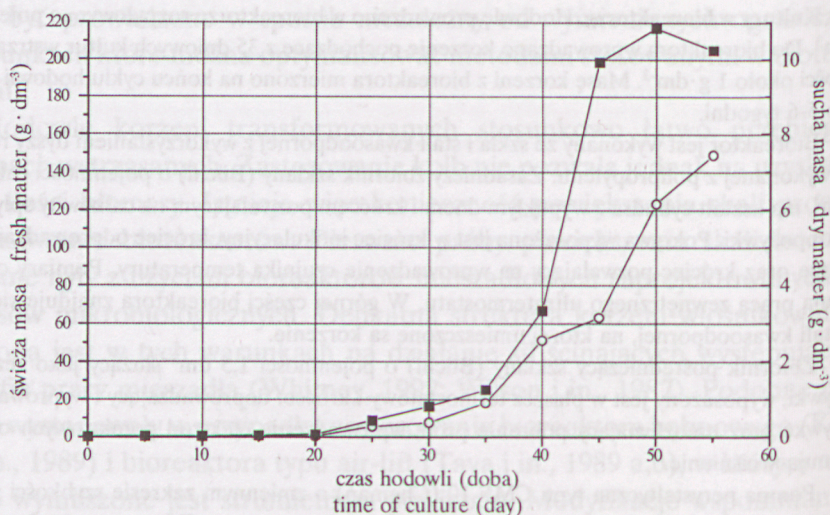
Pompa perystaltyczna typu CMF 10 (Chemap) o zmiennym zakresie szybkości pompowania 3÷400 cm³ · min⁻¹, wyposażona została w wężyk z tworzywa Tygon o podwyższonej odporności na ścieranie i uszkodzenia mechaniczne, co okazało się niezbędne dla długotrwałej pracy bioreaktora. Czas pracy pompy oraz przerw w podawaniu pożywki są regulowane w granicach od 30 s do 2 min przy pomocy zegara sterującego MC 5B (Fael).

Kultury korzeni w bioreaktorze prowadzono przez okres 6 tygodni. Konstrukcja bioreaktora zapewnia rozwój korzeni w warunkach aseptycznych w atmosferze jałowego powietrza przez cały czas pracy bioreaktora. Odpowiednie wytworzenie mgły rozpylonej pożywki uzyskano stosując laboratoryjną pompę perystaltyczną i dyszę rozpyłową o specjalnej konstrukcji. Stopień rozdrobnienia mgły był regulowany szybkością pracy pompy (szybkością wypływu cieczy). W stożku wytworzonej mgły najdrobniejsze kropelki, o średnicy rzędu kilku — kilkunastu μm znajdują się w jego strefie centralnej i one docierają do rosnących korzeni. Kropelki cieczy o większej średnicy, występujące w strefie zewnętrznej stożka mgły, uderzają o ścianę bioreaktora, skąd ciecz spływa na dno zbiornika.

Temperatura pożywki w granicach 25÷27°C jest utrzymywana przy użyciu termostatu Thermomix (Braun Biotech International). Opcjonalnie bioreaktor może być wyposażony w układ ciągłego pomiaru pH i konduktancji. Ten ostatni parametr proponowany jest w kulturach roślinnych in vitro do śledzenia dynamiki przebiegu procesu (Taya i in., 1989a,b), gdyż w miarę zmiany składu pożywki zmienia się jej przewodnictwo elektryczne.

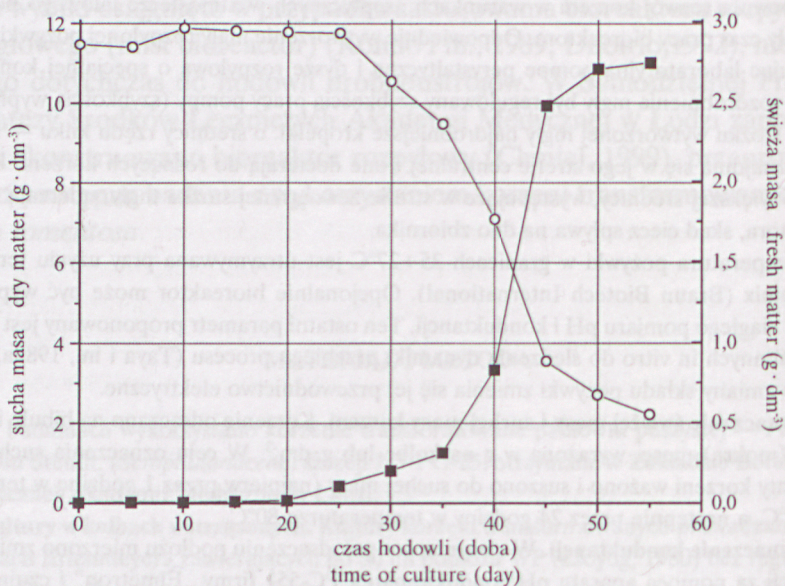
Oznaczanie świeżej masy i suchej masy korzeni. Korzenie odsączano na bibule i ważono świeżą (moką) masę, wyrażoną w g na kolbę lub g · dm⁻³. W celu oznaczenia suchej masy, fragmenty korzeni ważono i suszono do suchej masy (najpierw przez 1 godzinę w temperaturze 100°C, a następnie przez 24 godziny w temperaturze 80°C).

Oznaczenie konduktancji. W otrzymanym po odsączeniu podłożu mierzono zmiany konduktancji za pomocą aparatu pH/konduktometr CPC-551 firmy „Elmetron” i czujnika konduktometrycznego typ CD-2 (Hydromet).



Ryc. 1. Krzywa wzrostu korzeni transformowanych *Paulownia tomentosa*.
(1 — sucha masa, 2 — świeża masa)

Growth of transformed roots of *Paulownia tomentosa*. (1 — dry matter, 2 — fresh matter)



Ryc. 2. Zmiany konduktancji podłoża (2-) i suchej masy komórek (1-) podczas hodowli korzeni transformowanych *Paulownia tomentosa*
Medium conductivity (2-) and cell dry matter (1-) in the cultures of transformed roots of *Paulownia tomentosa*

WYNIKI I DYSKUSJA

W kulturach korzeni transformowanych w kolbach wstrząsanych podczas pierwszych 20 dni przyrost biomasy był nieznaczny — widoczna jest wyraźna faza adaptacyjna (ryc. 1). Przyspieszenie wzrostu następuje po 25 dniach hodowli. Największą szybkość wzrostu obserwuje się między 35 a 50 dniem hodowli — faza wykładniczego wzrostu. Później następuje faza zwolnionego wzrostu. Korzenie transformowane *Paulownia tomentosa* charakteryzuje stosunkowo długa faza adaptacyjna wzrostu, ale też wysoki przyrost świeżej masy od $0,25 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ podłoża do około $220 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Zmiany przewodności podłoża podczas hodowli przedstawiono na ryc. 2. Do 20 doby hodowli nie obserwowano zmian konduktancji, widoczną zmianę zauważono w 25 dniu hodowli, a gwałtowny spadek w 35-50 dniu hodowli, co przypadało na okres intensywnego wzrostu biomasy.

Pomiar konduktancji podłoża był dokonywany w celu znalezienia korelacji pomiędzy zmianą konduktancji i przyrostem biomasy. Wyznaczenie takiej zależności jest przydatne do określenia wzrostu biomasy podczas hodowli korzeni w bioreaktorze, gdzie nie jest możliwe bezpośrednie jej oznaczenie (Taya i in., 1989a,b).

W kulturze bioreaktorowej biomasę korzeni badano po zakończeniu hodowli, trwającej 6 tygodni. Stosując jako inokulat 5 g korzeni z kultur w kolbach wstrząsanych otrzymano plon biomasy równy 300 g świeżej masy ($200 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$), co stanowi 16 g suchej masy na 1 dm^3 podłoża. W pracy Taya i in. (1989 a) w hodowli korzeni transformowanych *A. rustica* w bioreaktorze typu air-lift o pojemności roboczej 300 cm^3 w czasie 31 dni otrzymano biomasę $2,8 \text{ g s.m.} \cdot \text{dm}^{-3}$, w bioreaktorze mieszadłowym (300 cm^3) po 25 dniach — biomasę $4,8 \text{ g s.m.} \cdot \text{dm}^{-3}$, a w bioreaktorze air-lift z korzeniami immobilizowanymi na mechanicznym nośniku — masę $11 \text{ g s.m.} \cdot \text{dm}^{-3}$. Whitney (1992) dla kultur *N. rustica* w bioreaktorach: rozpyłowym (mgłowym), ze złożem zraszającym oraz typu air-lift po 28 dobach otrzymał plon świeżej masy — odpowiednio: 255, 118 oraz $184 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Badania kultur korzeni transformowanych w bioreaktorze rozpyłowym w naszej pracowni są kontynuowane. Trwają prace dotyczące optymalizacji kultur korzeni w bioreaktorze i prace związane z modyfikacją bioreaktora.

PIŚMENNICTWO

- Chmiel A., 1992. Biotechnologia komórek roślinnych. *Biotechnologia*. 4, 19: 5-16.
- Chmiel A., Wysokińska H., 1997. Transformed root cultures for biotechnology. *Acta Biotechnol.* 17, 2: 131-159.
- Chmiel A, Pawłowska B., Kochan E., 1999. Bioreaktor rozpyłowy do kultur korzeni transformowanych, *Zesz. Nauk. PŁ, Inżynieria Chemiczna i Procesowa*, 26: 265-270.
- Diloirio A. A., Cheetham R. D., Weathers P. J., 1992. Growth of transformed roots in nutrient mist bioreactor: reactor: performance and evaluation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37: 457-462.
- Furmanowa M., 1992. Znaczenie biotechnologii roślinnej w wytwarzaniu cytostatyków, *Biotechnologia* 4, 19: 27-36.
- Hilton M. G., Rhodes J. C., 1990. Growth and hyoscyamine production of hairy root cultures of *Datura stramonium* in modified stirred tank reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 132-138.
- Kondo O., Honda H., Taya M., Kobayashi T., 1989. Comparison of growth properties of carrot hairy root in various bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 291-294.
- Lloyd G., McCown B., 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *Int. plant Prop. Cos.*, 30: 421-427.
- Olszowska O., 1992. Korzenie transformowane roślin leczniczych. *Biotechnologia*. 4, 19: 21-26.
- Nadolska-Orczyk A, 1999. Transformacja roślin za pomocą *Agrobacterium rhizogenes* — podstawowy model działania i czynniki na niego wpływające. *Biotechnologia*. 1, 44: 116-124.
- Taya M., Yoyama A., Kondo O., Kobayashi T., Matsui C., 1989a. Growth characteristics of plant hairy roots and their cultures in bioreactors. *J. Chem. Engin.* 1, 22: 84-88.
- Taya M., Hegglin M., Prenosil J. E., Bourne J. R., 1989b. On-line monitoring of cell growth in plant tissue by conductometry. *Enzyme Microb. Technol.*, 11: 170-176.
- Whitney P. J., 1992. Novel bioreactors for the growth of roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 13-17.
- Wilson P. D. G., Hilton M. G., Robins R. J., Rhodes M. J. C., 1987. Fermentation studies of transformed root cultures. *International Conference on Bioreactors and Biotransformations*. Glencagles, Scotland, UK.

SUMMARY

The culture of roots transformed with *Agrobacterium rhizogenes* is one of the most efficient ways of biosynthesis for many pharmacologically active metabolites. The hairy root cultures were kept in both shake flasks and bioreactor. In our laboratory a mist bioreactor was designed and built. The bioreactor was made of glass and stainless steel with the use of mist (dispersal) nozzle made of polypropylene. A peristaltic pump provided dispersion and recir-

ANNALES

cultulation of the medium. The temperature of medium was sustained on a constant level by an external thermostat controlled by measurement of temperature in the root-growing zone within the bioreactor. Usefulness of the laboratory mist bioreactor was checked using transformed roots of *Paulownia tomentosa*. The technical conditions of bioreactor operation were formulated. An optimisation study for that culture is being carried out.

IAN DYDUCH, AGNIESZKA NAJDA

Wpływ dorodności cebulek powietrznych czosnaka
strzałkującego (*Allium sativum* L.) na cechy morfologiczne
i jakość wyrostków z nich roślin

Influence of Sharpness of Air Bulbs of Winter Garlic (*Allium sativum* L.)
on the Morphological Features and Quality of Plants

Czosnek (*Allium sativum* L.) jest ważnym gatunkiem wśród warzyw cebulowych, znanym na całym świecie jako roślina przyprawowa o właściwościach dietetyczno-smakowych. Popularność swoją zawdzięcza wielokierunkowym właściwościom leczniczym, głównie bakterio- i grzybobójczym a także antykoagulantnym i przeciwnadciśnieniowym. Do ważnych składników czosnku należą substancje zawierające siarkę, tj. alina, tioglikozydy oraz sarsenki i wiotosarsenki, z obecnością których związany jest charakterystyczny zapach rośliny. Ponadto zawiera olejki eteryczne, glikozydy, flawonoidy, związki cukrowe, fitosterole, pektyny, witaminy i pierwiastki śladowe (Lisowski, 1987).

Zo względu na sterylność kwiatów, czosnek jest głównie rozmnażany wegetatywnie poprzez ząbki i cebulki kwiatostanowe (Jenderek, 1988). Jednak z przyczyn ekonomicznych, cebulki stanowią tańszy i pełnowartościowy materiał młocowy. Od dorodności materiału wyjściowego zależy wielkość i jakość uzyskanego plonu (Orłowski i wsp., 1984; Orłowski i wsp., 1989; Dyduch, 1993). Celowe zatem wydaje się prowadzenie badań nad tym zagadnieniem.

Niniejsza praca określa wpływ dorodności cebulek kwiatostanowych czosnaku strzałkującego na cechy morfologiczne oraz jakość wyrostków z nich roślin potomnych.